



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	miR-7977 inactivates the Hippo-YAP signaling pathway in bone marrow mesenchymal stromal cells (miR-7977 は骨髄間葉系幹細胞における Hippo-YAP シグナル経路を不活性化する。)
Author(s) 著 者	吉田, 正宏
Degree number 学位記番号	甲第 3025 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2018-03-31
Original Article 原著論文	札幌医学雑誌 第 87 巻 第 1 号 (平成 31 年 3 月) 掲載予定
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Edition

学位論文の内容の要旨

報 告 番 号	甲第 3025 号	氏 名	吉田 正宏
<p>論文題名</p> <p>miR-7977 inactivates the Hippo-YAP signaling pathway in bone marrow mesenchymal stromal cells</p> <p>miR-7977 は骨髄間葉系幹細胞における Hippo-YAP シグナル経路を不活性化する。</p> <p>研究目的</p> <p>急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形成症候群 (MDS) 患者において、間質細胞の分化障害、異常なサイトカイン発現、免疫監視機構の異常、microRNA (miRNA) 生成異常などを初めとした、様々な異常が骨髄微細環境でみられることが報告されている。しかしながら、AML および MDS においてこれらの異常が惹起される分子機構は明らかとされていない。最近我々は、エキソソームなどの細胞外小胞が骨髄微細環境内に高濃度で存在し、白血病細胞株から分泌される細胞外小胞内の miR-7977 が骨髄間葉系幹細胞 (MSC) に移行しすることを見出した。miRDB による検索で miR-7977 のターゲットの一つとして PCBP1 に着目し解析した結果、miR-7977 は PCBP1 の発現抑制を介して SCF および ANGPT1 mRNA の不安定性を惹起することを報告した。しかし、一般に micro RNA は多数の標的を持っており、miR-7977 の MSC における詳細な機能は不明のままである。本研究では、miR-7977 mimic を導入した骨髄間葉系幹細胞のトランスクリプトーム解析を行い、さらに differentially expressed genes (DEGs) の検出とパスウェイ解析を行った。その結果、検出された Hippo シグナル経路の遺伝子群に焦点を当てて解析した。</p> <p>研究方法</p> <p>1) 細胞培養</p> <p>ヒト骨髄 CD34 陽性細胞と健常人由来の MSC の 3 つのロット (MSC #1, #2, #3) は、AllCells, LLC (Toronto, Canada) から購入した。間葉系幹細胞は MSCGM™ hMSC basal medium に MSCGM hMSC SingleQuot Kit (Lonza Japan Ltd. Tokyo, Japan) を添加し培養した。MSC 細胞株の HTS5 は、10% FCS, 2 mM/L L-glutamine, 0.1% penicillin (100 U/mL) と streptomycin (100mg/mL) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて培養した。</p> <p>2) mRNA 発現解析</p>			

Trizol 試薬を用いて細胞から total RNA を抽出した。逆転写反応は Taqman PCR 用には SuperScript VILO を, SYBR® Green PCR 用には RT2 First Strand Kit を, miScript SYBR Green PCR 用には miScript II RT Kit を用いて行った。qRT-PCR は ABI PRISM 7300 Real-Time PCR System を用いて行った。

3) MSC への siRNA あるいは miRNA の導入

siRNA あるいは miRNA の導入は, Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent あるいは HiPerFect Transfection Reagent を用いた。mRNA 発現は, miRNA 導入後 48-72 時間後に qRT-PCR およびウエスタンブロッティング法により解析した。

4) ルシフェラーゼと GFP 標識 YAP1 を用いたレポーターアッセイ

8XGT10-luciferase, Plasmid#34615 は AddGene (Cambridge, MA) より, YAP1 (GFP-tagged)-pCMV6-AC-GFP (RG225864) は OriGene Inc. (Rockville, MD) より購入した。miR-7977 発現 plasmid (MIR-7977-MicroRNA) とコントロールベクター (pCMV-MIR) は OriGene Inc. より購入した。MSC あるいは HTS-5 に, これらのプラスミド 2 µg を Lipofectamine LTX transfection reagent を用いて導入した。導入後 48 時間で Lumat LB 9507 luminometer を用いてルシフェラーゼ活性を測定すると共に, GFP 標識 YAP1 の局在は, Biozero BZ-8000 laser scanning microscope を用いて解析した。

5) アレイデータの解析

MSC のトランスクリプトームは affymetrix 社の Human Gene 2.0ST Array®により解析した。得られた CEL データは, R commander (version 3.4.1) の affy パッケージを用いて行列データに変換した後, rma 法で正規化した。クラスター解析と DEGs の検出は, amap および limma パッケージを用いて解析し同定した。有意差変動の強い DEGs は, gplot を用いてヒートマップとして可視化した。

6) Gene set enrichment analysis (GSEA 解析) とネットワーク解析

GSEA 解析は, オープンソースのソフトウェアである GSEA3.0 を用いておこなった。遺伝子セットは h.all.v6.0.symbol.gmt [Hallmarks], c2.cp.biocarta.v6.0.symbols.gmt [Curated], c2.cp.kegg.v6.0.symbols.gmt, c2.cp.reactome.v6.0.symbols.gmt [Curated] and c6.all.v6.0.symbols.gmt [Oncogenic signature] を使用した。NOM p-val<0.05 または FDR q-val<0.25 を有意なパスウェイとし, Cytoscape software version 3.5.1 を用いてネットワーク図として展開した。

7) 統計解析

データセットは, Kolmogorov-Smirnov 試験で正規性の検定を行った。2 群間の有意差は ANOVA と Dunnett の多重比較により検定した。有意差は Student's t-test か Mann-Whitney U-test で検定した。p 値<0.05 を統計学的に有意と考えた。

研究成績

1) miR-7977 導入後のトランスクリプトームの変化

MSC における miR-7977 の機能を詳細に解析するために、MSC にコントロールと miR-7977 mimic を導入した。次に Human Gene 2.0ST Array® によってトランスクリプトーム解析を行った。散布図は骨髄 MSC に miR-7977 を導入した後、2 fold-change の変動を示した遺伝子を識別して図示した。0.05%の遺伝子が発現低下し、0.01%の遺伝子の発現が上昇していた。遺伝子発現の変化を分類するためにクラスター解析を行った後に、ヒートマップとして図示した。変動している DEGs のうち 19 遺伝子は miRDB が予測する miR-7977 の標的部位を有していた。しかしながら、42 遺伝子は標的部位を有しておらず、特に miR-7977 導入 MSC で上昇した全ての DEGs は、miR-7977 の標的部位を有していなかった。これらの遺伝子の発現レベルは間接的に上昇していることが示唆された。

2) パスウェイ解析

GSEA3.0 を用いてパスウェイ解析を行った。複数のパスウェイが検出されたが、その中で唯一 Hippo シグナル経路に関わる YAP1_UP において、 $NOM < 0.05$ かつ $FDR < 0.25$ と強い有意差を示していた。また、Hippo シグナル経路の上流である、KEGG_TIGHT_JUNCTION も $NOM < 0.05$ を示していたことから、両パスウェイを統合して、Cytoscape を使ってネットワーク図に展開し、アレイで得られた遺伝子変動をスーパー・インポーズしてヒートマップ化した。Hippo コアキナーゼである serine/threonine kinase 4 (STK4) の遺伝子発現が有意に低下していたことから、miR-7977 が STK4 発現低下を介して Hippo シグナルを制御する可能性が示唆された。

3) STK4 の qRT-PCR と Hippo シグナルのレポーターアッセイ

次に、qRT-PCR で STK4 の発現レベルを検討した。MSC および HTS5 に miR-7977 を導入すると、有意に STK4 の mRNA レベルが低下した。この結果から、miR-7977 が STK4 の発現レベルを低下させ、Hippo シグナル経路を不活性化することが想定された。これを確認するため、2 種類のレポーターアッセイを行った。第一に、GFP 標識 YAP1 を HTS5 に導入し、続いて、miR-7977 mimic を導入した。コントロール siRNA を導入した MSC では GFP 標識 YAP1 は細胞質に局在するが、miR-7977 mimic 導入 MSC では大部分の GFP 標識 YAP1 が核に移行していた。このことは、miR-7977 は Hippo シグナルを off の状態に誘導することを示唆していた。さらに、8 個の TEAD との結合部位を持つ 8XGTIIC ルシフェラーゼ・レポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。miR-7977 発現ベクターとともに導入した場合において有意にルシフェラーゼ活性が上昇していた。これらの結果から、miR-7977 は、YAP1 の核への移行を促進し、YAP1 が転写因子 TEAD と結合した後に、遺伝子発現を誘導することで、Hippo-YAP1 シグナル経路を抑制するものと考えられた。

4) miR-7977 導入間葉系細胞の機能解析

miR-7977 導入 MSC の機能を確認した。Hippo シグナル経路は、細胞の接着阻害に関わることが示されている、そのため、細胞がコンフルエンスに達したときの細胞密度を解析した。miR-7977 導入 HTS5 は、コントロール siRNA 導入 HTS5 と比較して、細胞密

度が有意に上昇した。Annexin V/PI アッセイでは、miR-7977 導入細胞とコントロール導入細胞間に、アポトーシスの差は認められなかった。細胞周期解析では、コントロールと比較して miR-7977 導入 HTS5 において、有意に S 期および G2/M の増加が認められた。これらの結果から、miR-7977 は Hippo シグナル経路の抑制によって細胞の接着阻害を不活性化させることが示唆された。

考察

本研究で、miR-7977 が STK4 の発現レベルを低下させ、MSC の Hippo-YAP1 シグナル経路を抑制する可能性を明らかにした。さらに、miR-7977 は接着阻害を不活性化し、その結果 MSC の細胞株である HTS5 の増殖を促進させた。

造血器腫瘍における Hippo-YAP1 シグナル経路の重要性は、多発性骨髄腫細胞において最近報告された。Cottini らは、骨髄腫細胞において Hippo-YAP1 シグナル経路を活性化することで、in vitro および in vivo で骨髄腫細胞に細胞死が誘導されることを示している。しかしながら、AML の病態生理における Hippo シグナル経路の役割は明らかとされていない。パブリックデータベースの GSE24395 を用いて、正常 CD34+CD38-造血幹細胞 (HSCs) と CD34+CD38-急性骨髄性白血病幹細胞 (LSCs) の YAP1 レベルを解析したところ、LSCs の YAP1 発現レベルは白血病のタイプにより多様であったが、転写因子 TEAD2 および TEAD4 は白血病のタイプに関わらず有意に低下していた。これらの結果から、LSCs の Hippo-YAP1 シグナル経路は、骨髄腫細胞と異なる異常を持つことが想定されるが、今後の解析が必要と思われた。

本研究では骨髄微細環境内の MSC に焦点を当て、白血病細胞から多量に産生・分泌される miR-7977 を、MSC に導入することで Hippo シグナル経路が阻害され、細胞増殖が促進することを明らかにした。この結果から想定されることは、AML 細胞に接している MSC は増殖能が亢進する可能性である。当教室のこれまでの研究で、miR-7977 を導入した MSC においては SCF, ANGPT1 および JAG1 が著減し正常造血幹細胞支持能が破綻することを報告した。一方で、AML 細胞と接している MSC は、in vitro で白血病幹細胞細胞の増殖を促進することを報告している。これらの知見から、白血病細胞はニッチの機能を HSCs にとっては不利な方向に、LSCs にとっては有利な方向に変化させる可能性を示している。しかしながら、白血病由来 miR-7977 と LSC ニッチの関係は不明であり、ゲノム編集技術などを応用した miR-7977 ノックアウト細胞などを用いたより詳細な解析が必要と考えられる。

結論

miR-7977 は MSC の Hippo-YAP1 シグナル経路を抑制する。急性骨髄性白血病の骨髄微細環境において、miR-7977-Hippo-YAP1 シグナル経路は MSC の増殖能を変化させる可能性がある。

論文審査の要旨及び担当者

平成 30 年 3 月 19 日提出

(平成 30 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 3025 号	氏 名	吉田 正宏
論文審査 担 当 者	主査 腫瘍内科学講座 教授 加藤 淳二	副査	フロンティア医学研究所 病態情報学部門 教授 小海 康夫
	副査 フロンティア医学研究所 免疫制御医学部門 教授 一宮 慎吾	委員	病理学第二講座 教授 澤田 典均

論文題名	<p>miR-7977 inactivates the Hippo-YAP signaling pathway in bone marrow mesenchymal stromal cells</p> <p>(miR-7977 は骨髄間葉系幹細胞における Hippo-YAP シグナル経路を不活性化する。)</p>
<p>結果の要旨</p> <p>急性骨髄性白血病から分泌される細胞外小胞内 miR-7977 は、骨髄間葉系幹細胞に移行し、Hippo シグナル経路のコアキナーゼである STK4 mRNA レベルを低下させ、Hippo シグナル経路を不活性化する。その結果、YAP1 の核内移行が促され、骨髄間葉系幹細胞の増殖能が亢進する。miR-7977 を導入した骨髄間葉系幹細胞は、PCBP1 の抑制を介して SCF や ANGPT1 などの造血因子の発現を低下させることが報告されており、miR-7977 は造血支持能が低下した骨髄間葉系幹細胞を増殖させ、ニッチの機能を正常造血にとって不利に変化させる可能性が示唆された。本研究は、急性骨髄性白血病における造血障害の新たな機序を見出し、学位論文として十分に値するものと考えられた。</p>	